

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 173–178

Mechanisierte Hormon-Analytik mittels simultaner Säulenchromatographie¹⁾

Von K. Horn, J. Henner, O. A. Müller und P. C. Scriba

Aus der II. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. E. Buchborn) der Universität München

(Eingegangen am 8. November 1974/19. März 1975)

Es wird eine Übersicht über ein Methoden-Prinzip gegeben, bei dem in einem Arbeitsgang durch Einsatz einer 25-Kanal-Proportionierpumpe 25 Proben auf 25 parallelen Säulen chromatographisch aufgetrennt werden können. Das Auftragen der einzelnen Proben, Reagenzien und Elutionspuffer, sowie das Sammeln der Eluate in Fraktionen läuft dabei jeweils zeitgesteuert automatisch ab. Dieses Prinzip der simultanen Säulenchromatographie hat sich bei uns inzwischen für die mechanisierte Routine-Bestimmung des Gesamt-Thyroxins im Serum (kompetitive Proteinbindungsmethode), T_3 -in vitro-Test (Dextrangelfiltration), Gesamt- T_3 (Radioimmunoassay) und Cortisol im Serum (kompetitive Proteinbindungsmethode und Radioimmunoassay) bewährt. Der Hauptvorteil liegt hierbei neben höherer Kapazität und geringerem Kostenaufwand in der besseren Spezifität und Standardisierung dieser Methoden, welche die Gemeinsamkeit aufweisen, daß das zu bestimmende Hormon vor dem Meßvorgang aus dem Serum mechanisiert extrahiert werden kann.

Simultaneous column chromatography for the automatic determination of hormones

The automatic determination of hormone levels in serum by column chromatographic methods using a 25 channel peristaltic pump, allows the simultaneous chromatography of 25 samples. The different volumes which are necessary for the successive elution steps are set by the tubing size of the pump and by a preset switch clock. The eluates from the 25 columns are collected simultaneously in fractionated volumes which are also determined with the same electronic clock device.

The assays so far adapted to this principle are reviewed: Serum thyroxine (competitive protein binding assay), T_3 -uptake test (dextran gel filtration), triiodothyronine (radioimmunoassay) and cortisol (competitive protein binding assay or radioimmunoassay). The main advantages of this procedure are increased frequency, improved specificity and standardization at lower costs for these methods. The principle of simultaneous column chromatography appears to be most suited for assays, which require various extraction steps prior to the determination of the hormone, since it allows extraction, specific protein binding and bound/free separation on only one column.

Die Vorteile der Hormon-Analytik mit den spezifischen Proteinbindungs- bzw. radioimmunologischen Methoden sind unbestritten. Die derzeit publizierten Verfahren z. B. der Schilddrüsenhormon- oder Corticosteroid-Bestimmung haben jedoch vorwiegend den Nachteil, daß sie bisher kaum automatisierbar sind, im Gegensatz z. B. zu dem deshalb immer noch sehr verbreiteten, aber unspezifischeren $PB^{127}J$. Zudem wird besonders bei den kommerziell angebotenen Testkits kritisiert, daß die Anforderungen der Qualitätskontrolle nicht genügend erfüllt und die Kosten erheblich sind (1). Die Schwierigkeiten der Mechanisierung und damit der Standardisierung liegen vor allem in der erforderlichen Extraktion der Hormone aus dem Serum, wozu überwiegend organische Lösungsmittel verwendet werden. Kritisch ist ferner der Schritt der Trennung in Bound- und Free-Fraktion, der bei der Verwendung der üblichen Adsorbentien wie Charcoal, Ionenaustauscherharzen, Dextrangel etc. in hohem Maße temperatur- und zeitabhängig ist. Wie kritisch diese Punkte sind, d. h. wie wenig standardisiert und damit nicht direkt vergleichbar die bisherigen Ver-

fahren z. B. sind, zeigte ein kürzlich von der Sektion Schilddrüse der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie durchgeführter Ringversuch für die T_3 - und T_4 -Bestimmung (Rottach 1975, Publikation in Vorbereitung). In den letzten Jahren wurde von uns ein Prinzip entwickelt, bei dem mechanisiert und damit standardisiert sowohl die Extraktion der Hormone aus dem Serum als auch die Auftrennung in die Bound- und Free-Fraktion zeit- und temperaturkonstant im geschlossenen System mittels simultaner Säulenchromatographie abläuft. Dieses Prinzip der mechanisierten Hormon-Analytik hat sich bei uns inzwischen für die Messung des Gesamt- T_4 , T_3 -in vitro-Tests, Gesamt- T_3 und Cortisols im Serum bewährt.

Diese Mitteilung ist eine Zusammenfassung und Ergänzung der bisherigen z. T. vorläufigen methodischen Veröffentlichungen (2, 3, 4, 5, 6, 7). Erstmals werden die nach diesem Methoden-Prinzip ohne vorherige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln und ohne Inkubation durchführbare radioimmunologische Cortisol-Bestimmung, sowie eine methodische Verbesserung und Standardisierung für die Bestimmung des sog. freien 3H -Cortisols ausführlich dargestellt. Das besondere

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

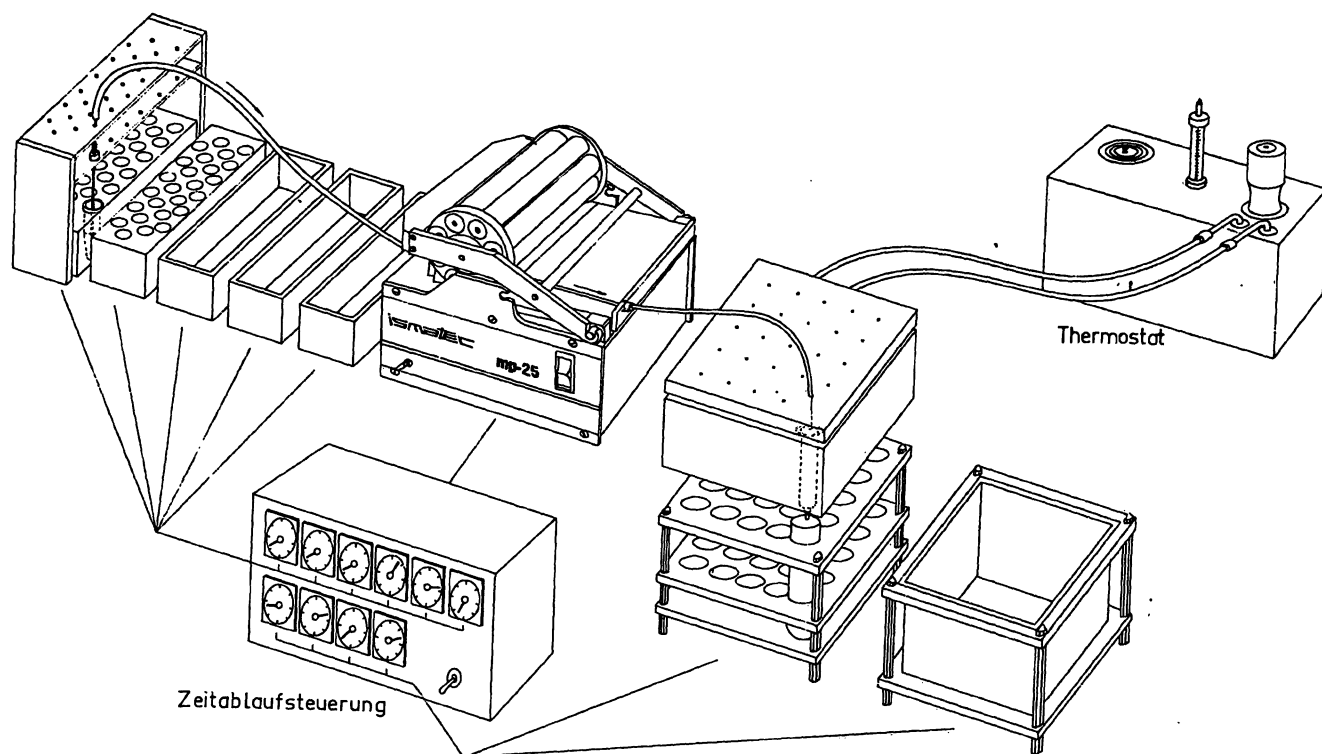


Abb. 1. Schematische Darstellung der Apparatur zur simultanen Säulenchromatographie
Erklärung siehe Text.

Gewicht dieser Übersicht liegt auf der Beschreibung der allen diesen Methoden gemeinsamen Mechanisierung, wobei die Apparatur für die simultane Säulenchromatographie und die praktische Durchführung der einzelnen Methoden auf dieser Apparatur detailliert angegeben werden.

Methodik

Prinzip

Durch Uhren gesteuert, werden nacheinander mit Hilfe einer 25-Kanal-Proportionierpumpe Serumproben, Reagenzien und Pufferlösungen angesaugt und über Säulen, die in einem Thermoblock temperaturkonstant gehalten werden, chromatographisch aufgetrennt. Die jeweiligen Eluate werden zeitgesteuert in verschiedenen Fraktionen aufgefangen. Durch Verwendung der 25-Kanal-Proportionierpumpe können in einem Arbeitsgang gleichzeitig 25 Proben aufgearbeitet werden. Die jeweiligen Durchflußraten können durch Wahl verschiedener Pumpenschläuche variiert werden. Die Chromatographie-Säulen können jeweils über längere Zeit immer wieder verwendet werden.

Apparatur zur simultanen Säulenchromatographie (Abb. 1)²⁾

25 Säulen (Zylinder von 2 oder 5 ml Plastik-Einmalspritzen) sind in einem passenden Aluminiumblock angeordnet. Die Temperaturkonstanz ist durch einen Thermostaten mit Umwälzpumpe gewährleistet (kontinuierlicher Wasserdurchfluß durch eine mäanderförmige Bohrung des Blockes). Der Auslauf der 25 Säulen kann durch einen Zentralverschluß simultan verschlossen werden. Der Zulauf zu den Säulen erfolgt über 25

Kanülen, die dicht in der oberen Abdeckplatte eingelassen sind. Gleiche Durchflußraten für alle 25 Säulen werden durch den Einsatz einer 25-Kanal-Proportionierpumpe erzielt, wobei die Pumpvolumina durch den inneren Durchmesser der Proportionierschläuche festgelegt werden können. Über 25 Kanülen, die an einem Probennehmerarm am Eingang der Pumpe befestigt sind, können nacheinander die Probenansätze, Puffer- und Reagenzienlösungen angesaugt und auf die Säulen aufgetragen werden, wobei die jeweiligen Volumina durch eine entsprechende Zeitvorwahl standardisiert einstellbar sind. Die Eluate von den Säulen können ebenfalls zeitgesteuert standardisiert in einzelnen Fraktionen aufgefangen werden. Durch den Einsatz einer zentralen Zeitablaufsteuerung laufen die Einzelschritte der Chromatographie mit Probennahme und Fraktions sammeln automatisiert ab. Nach diesem Prinzip der simultanen Säulenchromatographie haben wir bisher die im folgenden beschriebenen Verfahren mechanisiert.

Bisher erprobte Methoden

1. Gesamt-Thyroxin im Serum (2, 3)

Prinzip: Auf alkalisierten kleinen Säulen mit 2 ml Sephadex G-25 superfine wird das endogene und zugesetzte Tracer- T_4 quantitativ aus dem Serum extrahiert und adsorbiert. Nach einem Umpufferungsschritt wird mit einer Lösung von thyroxinbindendem Globulin (TBG) (z. B. ca. 1 : 80 verdünntes Serum von Patientinnen unter Östrogen-Therapie) der jeweilige TBG-gebundene Anteil des T_4 - ^{125}J eluiert und in einem Röhrchen zur Messung der Radioaktivität gesammelt. Nach Elution des freien Anteils des T_4 - ^{125}J mit einer 25 g/l Polyvinylpyrrolidonlösung in 50 mmol/l NaOH in 150 mmol/l NaCl sind die Säulen bereits wieder für den nächsten Durchgang bereit. Auf denselben Säulen erfolgt also nacheinander die Extraktion des T_4 aus dem Serum, die kompetitive Proteinbindungsanalyse und die B/F-Trennung im geschlossenen System. Die praktische Durchführung (3) ist in Tabelle 1 aufgezeigt.

²⁾ Hersteller Fa. Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen

Tab. 1. Ablauf der kompetitiven Proteinbindungsanalyse von T₄
Flußrate 400 µl/min, Temperatur 29 °C, 2 ml Sephadex G-25 s.f.

Eingabe	Fraktionssammeln
1 min Inkubationsansatz (100 µl Probe, 100 µl T ₄ -Tracer und 200 µl 0,1 mol/l NaOH)	13 min verwerfen (Serumpro- teine und Tracerverun- reinigungen)
10 min 50 mmol/l Barbita- l-puffer pH 8,6	
2 min TBG-Lösung (s. Text)	
8 min 50 mmol/l Barbita- l-puffer pH 8,6	8 min TBG-gebundenes T ₄ - ¹²⁵ J (%B)
4 min 25 g/l Polyvinylpyrroli- don ³⁾ in 50 mmol/l NaOH	9 min verwerfen oder zur Kontrolle zählen (%F)
5 min 50 mmol/l NaOH in 150 mmol/l NaCl ⁴⁾	

Ergebnisse

Qualitätskontrolle, Kapazität und Normalbereich

Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einem gepoolten Kontrollserum geprüft, sie ist mit einem Variationskoeffizienten von 7,4% ($49,8 \pm 3,7 \mu\text{g/l}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 58$) in der Routine-Laboratoriumsdiagnostik sehr zufriedenstellend. Die Wiederfinderaten von T₄-Eichstandards im Serum lagen bei 100%. Die Meßwerte bei verschiedenen Verdünnungen eines Hyperthyreoten-Serums lagen auf der Eichkurve. Die Kapazität ist mit jeweils 25 Proben in etwa 30 min gut (Tab. 1). Hierdurch können wirtschaftlich günstig mehr als 100 Bestimmungen täglich von einer Technischen Assistentin leicht durchgeführt werden. Der von uns ermittelte Normalbereich liegt zwischen 45,0 und 100,0 µg/l Thyroxin.

Störfaktoren

Erhöhte Thyroxin-Spiegel ohne Hyperthyreose werden bei erhöhtem TBG-Gehalt des Serums (Gravidität, Oestrogen- und Antioovulantien-Behandlung, genetisch bedingte Erhöhung der TBG-Spiegel etc.) gefunden, erniedrigte T₄-Spiegel ohne Hypothyreose bei Verminderung des TBG-Gehaltes im Serum bzw. bei Verdrängung der Schilddrüsenhormone aus der Serumproteinbindung (Behandlung mit Androgenen, Steroiden, Salicylaten, Diphenylhydantoin u. a., sowie bei Dysproteinämie, vor allem beim nephrotischen Syndrom). Abgesehen von Fällen mit disproportionierter T₃-Mehrsekretion erlaubt jedoch der Index des freien Thyroxins, der sich durch Multiplikation des Gesamt-T₄ mit dem T₃-in vitro-Test (s. unten, 2) berechnet, die richtige Aussage über die Schilddrüsenfunktion.

2. T₃-in vitro-Test (3, 4)

Prinzip: Radioaktives T₃ wird mit Serum inkubiert und die Verteilung des Tracers zwischen Serum-Proteinen und Dextran gel säulenchromatographisch gemessen. Dieses Verfahren

³⁾ Polyvinylpyrrolidon K 30 (Fa. Roth, Karlsruhe)

⁴⁾ bzw. beim letzten Durchgang des Tages 50 mmol/l Barbitall-puffer pH 8,6 (die Säulen werden bei neutralem pH aufbewahrt und sind über viele Wochen immer wieder verwendbar).

hat sich bei uns seit mehreren Jahren für die indirekte Erfassung von Veränderungen der Spiegel an Thyroxin-bindendem Globulin bewährt. Die praktische Durchführung (3) zeigt Tabelle 2.

Tab. 2. Ablauf des T₃-in vitro-Tests
Flußrate 400 µl/min, Temperatur 29 °C, 2 ml Sephadex G-25 s.f.

Eingabe	Fraktionssammeln
1 min Inkubationsansatz (100 µl Serum und 300 µl T ₃ -Tracer)	11 min verwerfen oder zur Kontrolle zählen (%B)
8 min 50 mmol/l Barbita- l-puffer pH 8,6	
4 min 50 g/l Polyvinylpyrroli- don ³⁾ in 0,15 mol/l NaCl	10 min sog. freies T ₃ - ¹²⁵ J (%F)
8 min 50 mmol/l Barbita- l-puffer pH 8,6	

Ergebnisse

Qualitätskontrolle, Kapazität und Normalbereich

Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einem gepoolten Kontrollserum geprüft, sie ist mit einem Variationskoeffizienten von 3,5% ($37,5 \pm 1,3\%$, $\bar{x} \pm s$, $n = 54$) sehr zufriedenstellend. Die Kapazität ist mit jeweils 25 Proben in etwa 20 min gut. Der an Hand eines schilddrüsengesunden Kontroll-Kollektivs berechnete Normalbereich für das sog. freie T₃-¹²⁵J liegt zwischen 32 und 42%, für den Index des freien Thyroxins zwischen 20 und 38 µg/l. Die Größenordnung dieser Parameter ist durch unsere Versuchsanordnung bedingt und keinesfalls mit dem wirklich freien Anteil der Schilddrüsenhormone identisch, sondern korreliert lediglich damit. Dies ist bei allen vergleichbaren Verfahren der Fall.

Störfaktoren s. o., 1. Gesamtthyroxin im Serum

3. Radioimmunologische Bestimmung des Gesamt-Trijodthyronins im Serum (3, 6)

Bei den üblichen radioimmunologischen Bestimmungsmethoden für T₃ werden sog. TBG-blockierende Substanzen eingesetzt. Wegen der unterschiedlichen Konzentrationen der Serumproben an Thyroxin-bindendem Globulin bleibt aber die Richtigkeit der T₃-Bestimmung im unextrahierten Serum auch bei Zusatz von diesen Substanzen, wie z. B. 8-Anilino-Naphthalene-Sulfonic acid (ANS), Thimerosal, Natrium-Salicylat, Tetraiodthyronin und Tetrachlorthyronin allerdings kritisch. Das verdeutlichte auch der eingangs erwähnte Ringversuch. Diese Schwierigkeiten werden durch die Extraktion des T₃ aus dem Serum vor der radioimmunologischen Bestimmung umgangen. Die vorherige Abtrennung des T₄ ist bei Verwendung eines hochspezifischen T₃-Antikörpers mit einer Kreuzreaktion mit T₄ unter 0,2% in der Routine-Diagnostik nicht erforderlich, dagegen jedoch bei wissenschaftlichen Fragestellungen, wie z. B. bei Bestimmung der Konversionsraten von T₄ zu T₃.

Prinzip: Auf alkalisierten kleinen Säulen mit 2 ml Sephadex G-25 superfine wird T_3 quantitativ aus dem Serum extrahiert, die Serumproteine verworfen und danach das T_3 in einem relativ schmalen Peak deutlich vor dem T_4 -Peak eluiert (Abb. 2). Nach Umpuffern des Eluates und Inkubation mit T_3 -Antikörper⁵⁾ über Nacht wird auf den gleichen Sephadexsäulen die B/F-Trennung nach dem Prinzip des T_3 -in vitro-Tests (s. oben 2) durchgeführt. Die Säulen sind über viele Wochen immer wieder verwendbar. Die praktische Durchführung zeigt Tabelle 3.

Ergebnisse

Qualitätskontrolle, Kapazität und Normalbereich

Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einem gepoolten Kontrollserum geprüft, sie ist mit einem Variationskoeffizienten von 7,5% ($1,07 \pm 0,08 \mu\text{g/l } T_3$, $\bar{x} \pm s$, $n = 48$) sehr zufriedenstellend. Die Wiederfinderraten von T_3 -Eichstandards in Serum lagen bei 100%. Die Meßwerte eines Hyperthyreoten-Serums lagen bei verschiedenen Verdünnungen jeweils auf der Eichkurve. Die untere Nachweisgrenze liegt bei $0,15 \mu\text{g/l}$. Eine Kreuzreaktion des T_4 bei der radioimmunologischen T_3 -Bestimmung, die durch Zusatz von hohen Konzentrationen säulenchromatographisch gereinigter T_4 -Eichstandard-Lösungen (Abb. 2) von 100–1000 $\mu\text{g } T_4/\text{l}$ geprüft wurde, war auf Grund der quantitativen Abtrennung des T_4 (Abb. 2) nicht nachweisbar.

Die Kapazität dieser Methode ist mit einem Zeitaufwand für die Extraktion des T_3 aus dem Serum und die

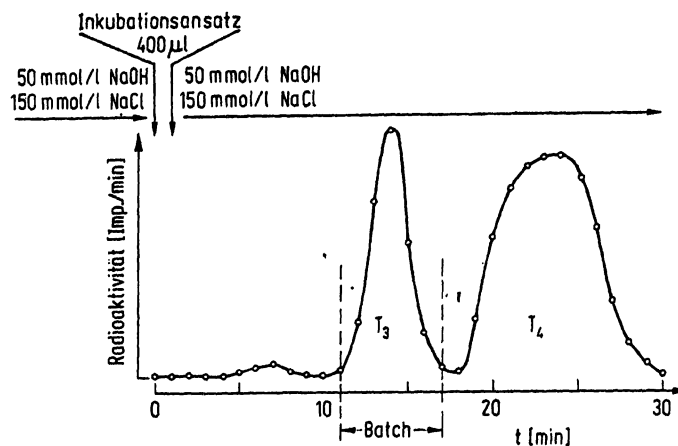


Abb. 2. Mechanisierte Extraktion des T_3 aus dem Serum. Schema der Chromatographie und Fraktionierung auf Sephadex G-25

Aufgezeichnet ist das Elutionsprofil eines Inkubationsgemisches von jeweils 100 μl TBG-reichen Serums, T_3 - und T_4 -Tracerlösung und 0,1 mol/l NaOH von einer alkalisierten Säule mit 2 ml Sephadex G-25 superfine. Die Flußrate liegt bei 0,4 ml pro min. Der T_3 -Peak wird als Batch in einem Röhrchen gesammelt (vgl. Tabelle 3).

Bound-Free-Trennung von jeweils weniger als 30 min sehr zufriedenstellend. Der von uns ermittelte Normalbereich liegt zwischen $0,80$ und $1,50 \mu\text{g } T_3/\text{l}$.

Störfaktoren

„Falsch“ hohe Serum-Trijodthyronin-Spiegel werden wie beim Gesamt-Thyroxin bei erhöhtem TBG-Gehalt des Serums, „falsch“ niedrige T_3 -Spiegel bei Verminderung des TBG-Gehaltes des Serums gemessen (s. oben 1). Eine relative T_3 -Mehrsekretion auf Grund von Jodmangel konnte bei Patienten mit blander Struma nachgewiesen werden (5, 11), eine T_3 -Rest-Sekretion wird bei Patienten mit Hypothyreose gefunden, wobei die T_3 -Spiegel sogar noch im Normbereich liegen können (5). Bei den Hyperthyreosen mit erhöhtem T_4 -Spiegel sind auch die T_3 -Spiegel erhöht, Fälle von isolierter Erhöhung nur der T_4 -Spiegel (Blockierung der Dejodierung des T_4 zum T_3) sind uns aus der Literatur bisher nicht bekannt. Dagegen gibt es jedoch Fälle von sog. T_3 -Thyreotoxikosen mit erhöhten T_3 -Spiegeln, wobei das Gesamt- T_4 im Serum und der T_3 -in vitro-Test jeweils normal sogar erniedrigt gefunden werden. Das zeigt, daß die Serum- T_3 -Spiegel nicht für sich allein betrachtet werden können, sondern nur zusammen mit dem Ergebnis der T_4 -Bestimmung und dem T_3 -in vitro-Test.

4. Gesamt-Cortisol im Serum (Proteinbindungsmethode (7) oder Radioimmunoassay)

Prinzip: Auf sauren Säulen mit 5 ml Sephadex G-10 wird das Cortisol quantitativ aus dem Serum extrahiert und adsorbiert. Nach einem Umpufferungsschritt wird durch Nachwaschen mit CBG-reichem Serum (etwa 1 : 50 verdünntes Serum von Östrogen-behandelten Patientinnen nach Dexámethason-Suppression) oder Cortisol-Antikörperlösung (1 : 2000 verdünntes Cortisol-Antiserum, P. VECSEL, Heidelberg) der je-

Tab. 3. Ablauf der radioimmunologischen T_3 -Bestimmung. Flußrate 400 $\mu\text{l}/\text{min}$, Temperatur beim Extraktionsschritt 37°C bzw. 29°C bei der B/F-Trennung, 2 ml Sephadex G-25 s.f.

Eingabe	Fraktionssammeln
a) Extraktionsschritt	
1 min Inkubationsansatz (100 μl Probe, 100 μl T_3 -Tracer und 200 μl 0,1 mol/l NaOH)	11 min verworfen (Serumproteine und Tracerverunreinigungen)
17 min 50 mmol/l NaOH in 150 mmol/l NaCl	6 min T_3 -Peak ⁶⁾
b) B/F-Trennung	15 min Antikörper-gebundenes T_3 - ¹²⁵ I (%B)
7 min T_3 -Peak ⁶⁾	
8 min 50 mmol/l Barbitallpuffer pH 8,6	
4 min 50 g/l Polyvinylpyrrolidon ³⁾ in 0,15 mol/l NaCl	12 min verworfen oder zur Kontrolle zählen (%F)
8 min 50 mmol/l Barbitallpuffer pH 8,6	

⁵⁾ Für die freundliche Überlassung von T_3 -Antiserum danken wir Herrn Dr. Hesch, Göttingen, der Firma Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach, und Firma Henning, Berlin.

⁶⁾ Der T_3 -Peak (Abbildung 2) wird mit 200 μl Tris-HCl-Lösung (120 μl 1 mol/l HCl und 80 μl 1 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,0) umgepuffert. Nach Zusatz von 100 μl T_3 -Antikörperlösung (bei uns derzeit 1 : 15000 verdünntes Antiserum in 50 mmol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,0 mit einem Zusatz von 7 mg/l Kaninchen-Gammaglobulin) wird über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 4. Ablauf der Cortisolbestimmung im Serum (Proteinbindungsmethode oder Radioimmunoassay)
Flußrate 250 µl/min, Temperatur 26 °C, 5 ml Sephadex G-10

Eingabe	Fraktionssammeln
1 min Inkubationsansatz (100 µl Probe, 50 µl ³ H-Cortisol- Tracer und 100 µl 0,1 mol/l HCl)	20 min verwerfen (Serumproteine)
11 min 0,2 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,0	
2 min CBG- oder Cortisolantikörper-Lösung (s. Text)	
12 min 0,2 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,0	14 min CBG-bzw. Antikörpergebundenes ³ H-Cortisol (%B)
6 min 1:3 verdünntes Nachwaschserum (s. Text)	
16 min 0,1 mol/l HCl ⁷⁾	14 min verwerfen oder zur Kontrolle zählen (%F)

weilige CBG- bzw. Antikörper-gebundene Anteil des ³H-Cortisols eluiert und zur Messung der Radioaktivität gesammelt. Nach Elution des freien Anteils des ³H-Cortisols mit einem Überschuß Nachwaschserum (mit Florisil ausgeschütteltes Restserum aus der Klinischen Chemie) stehen die Säulen bereits wieder für den nächsten Durchgang zur Verfügung. Die praktische Durchführung (7) ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Ergebnisse

Qualitätskontrolle, Kapazität und Normalbereich

Die Präzision von Tag zu Tag wurde mit einem gepoolten Kontrollserum geprüft, sie ist mit einem Variationskoeffizienten von 12,1% ($142 \pm 17 \mu\text{g/l}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 46$) bei der kompetitiven Proteinbindungsanalyse bzw. 8,0% ($139 \pm 11 \mu\text{g/l}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 24$) beim Radioimmunoassay sehr zufriedenstellend. Die Wiederfinderaten von Cortisol-Eichstandards im Serum lagen bei $96 \pm 5\%$ (Proteinbindungsmethode) bzw. $91 \pm 11\%$ ($\bar{x} \pm s$) beim Radioimmunoassay. Die entsprechenden Meßwerte für verschiedene Verdünnungen eines Serums lagen jeweils auf der Eichkurve. Die Spezifität der kompetitiven Proteinbindungsanalyse ist bei diesem säulenchromatographischen Verfahren deutlich besser als nach Dichlormethanextraktion (7). Durch Einsatz eines Antiserums konnte die Spezifität weiter verbessert werden, besonders wegen der geringeren Mitreaktion des Corticosterons (Abb. 3). Die untere Nachweisgrenze ($B_0 \pm 3 s$) liegt bei unserem Meßbereich, der aus praktischen Erwägungen am Normalbereich orientiert wurde, bei etwa $10 \mu\text{g/l}$ (Proteinbindungsmethode) bzw. bei etwa $1 \mu\text{g/l}$ (Radioimmunoassay). Diese Empfindlichkeit – besonders die des Radioimmunoassay – könnte bei Bedarf jedoch erheblich gesteigert werden.

⁷⁾ bzw. beim letzten Durchgang des Tages 0,2 mol/l Tris-HCl-Puffer pH 8,0 (die Säulen werden bei neutralem pH aufbewahrt und sind über viele Wochen immer wieder verwendbar).

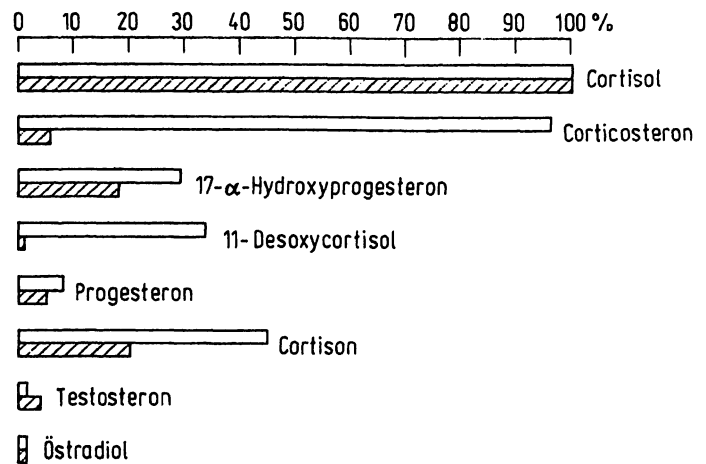


Abb. 3. Mitreaktion anderer Steroidhormone bei der mechanisierten Cortisol-Bestimmung auf Sephadex G-10:

□ kompetitive Proteinbindungsanalyse
▨ Radioimmunoassay

Analog zu den Cortisol-Standards wurden hier verschiedene Konzentrationen anderer Steroide in dem Assay eingesetzt und ihre Mitreaktion in % Cortisol berechnet.

Die Kapazität ist mit jeweils 25 Proben in 48 min gut, so daß von einer Technischen Assistentin über 100 Bestimmungen täglich durchgeführt werden können. Der Normalbereich für den 9 Uhr-Nüchternwert liegt bei $111 \pm 37 \mu\text{g/l}$ (Werte zwischen 45 und $200 \mu\text{g/l}$, Proteinbindungsmethode, $n = 68$) bzw. $95 \pm 40 \mu\text{g/l}$ (Werte zwischen 38 und $188 \mu\text{g/l}$, Radioimmunoassay, $n = 45$). Der 30-Minuten-Stimulationswert auf 0,25 mg ACTH i.v. lag bei 328 ± 71 bzw. $349 \pm 110 \mu\text{g/l}$ ($n = 19$), die 9 Uhr-Nüchternwerte 11 Stunden nach 2 mg Dexamethason oral ($n = 14$) bei 26 ± 8 bzw. $9 \pm 4,5 \mu\text{g/l}$ ($\bar{x} \pm s$).

Störfaktoren

In der Gravidität und unter Oestrogenbehandlung ist bekanntermaßen das endogene CBG und damit die CBG-Bindungskapazität erhöht. Daraus resultieren erhöhte Gesamt-Cortisolspiegel im Serum, die prozentualen freien Anteile sind dagegen entsprechend erniedrigt. Ein guter Parameter für die indirekte Messung dieser CBG-Bindungskapazität ist der sog. ³H-Cortisol-in vitro-Test, der in Anlehnung an den T₃-in vitro-Test in der Schilddrüsenhormon-Analytik aufgebaut wurde. Es wird hierbei 200 µl Serum inkubiert und die Verteilung des Tracers zwischen Serumproteinen und Dextrangel säulenchromatographisch über 5 ml Sephadex G-50 superfine gemessen (12). Der Normalbereich für das sog. freie ³H-Cortisol liegt bei uns zwischen 18,2 und 30,5% ($\bar{x} \pm 2 s$, $n = 43$).

Diskussion

Der Einsatz chromatographischer Verfahren in der diagnostischen Hormon-Analytik ist bisher durch den hohen methodischen Aufwand limitiert. Den Vorteilen der höheren Spezifität stehen z. B. bei der Thyroxin- und Cortisol-Bestimmung vor allem die Nachteile eines

großen Arbeitsaufwandes und einer geringen Kapazität entgegen, so daß diese Methoden in der Routine-Laboratoriumsdiagnostik bisher wenig praktikabel waren. Ein wesentlicher Fortschritt bei der Mechanisierung dieser chromatographischen Verfahren konnte durch das hier vorgestellte Prinzip der simultanen Säulenchromatographie erzielt werden, wobei 25 Proben gleichzeitig in einem Arbeitsgang zeit- und temperaturkonstant aufgearbeitet werden können.

Über die Möglichkeit einer quantitativen Extraktion des Thyroxins bzw. Cortisols aus dem Serum mit nachfolgender kompetitiver Proteinbindungsanalyse auf den jeweils gleichen Dextrangelsäulen wurde bereits früher berichtet (2, 3, 6, 7, 12, 13). Mit Hilfe der Mechanisierung nach dem Prinzip der simultanen Säulenchromatographie können diese Methoden der Gesamt-Thyroxin- und Cortisolbestimmung im Serum jetzt erfolgreich in der klinischen Routineanalytik eingesetzt werden. Die Vorteile dieser chromatographischen Verfahren gegenüber anderen Methoden, vor allem gegenüber den kommerziell vertriebenen Testkits, liegen zunächst in der Mechanisierung selbst, nämlich durch die Standardisierung der störanfälligen Schritte (Extraktion der Hormone aus dem Serum ohne organische Lösungsmittel, Zeit- und Temperaturkonstanz der eigentlichen Proteinbindungsreaktion und der B/F-Trennung), sowie in der größeren

Kapazität bei geringerem Kostenaufwand. Daneben ist die Spezifität dieser Methoden durch die Säulenchromatographie verbessert worden:

1. durch die Abtrennung der Hormone von den bindenden Serumproteinen, die gerade bei der radioimmunologischen T_4 - und T_3 -Bestimmung im unextrahierten Serum auch bei Zusatz von sog. blockenden Substanzen, wie ANS (14) und Merthiolat (15) stören (6, 8, 9, 10),
2. bei der radioimmunologischen T_3 -Bestimmung zusätzlich durch die Abtrennung des T_4 und
3. bei der Cortisol-Bestimmung durch eine stärkere Adsorption der mit dem Antikörper bzw. CBG-Serum kreuzreagierenden Steroide am Sephadex G-10 (7).

Denkbar wäre eine Anwendung dieses Prinzips der simultanen Säulenchromatographie auch für weitere Bestimmungsmethoden, z. B. für andere Steroidhormone.

Das hier noch einmal zusammenfassend dargestellte Prinzip der simultanen Säulenchromatographie erhält seinen besonderen Wert durch die Möglichkeit, im gleichen System auf derselben Säule Extraktionsschritte (Schilddrüsenhormone und Cortisol), die Bindung an das „spezifische“ Protein und die Bound/Free-Trennung durchführen zu können.

Literatur

1. Klein, E., Kracht, J., Krüskemper, H.-L., Reinwein, D. & Scriba, P. C. (1973), *Deut. Med. Wochenschr.* 98, 2362–2370.
2. Horn, K., Habermann, J., Henner, J., zur Horst, I. & Scriba, P. C. (1972), *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 259, 222, Abstract.
3. Horn, K., Henner, J. & Scriba, P. C. (1974), *Ärzt. Lab.* 20, 177–184.
4. Horn, K., Henner, J. & Scriba, P. C. (1971), *Mitt. Deut. Ges. Klin. Chem.* 2, 29–33.
5. Horn, K., Ruhl, T. & Scriba, P. C. (1972), *diese Z.* 10, 99–103.
6. Blümel, K. R., Horn, K. & Scriba, P. C. (1974), *diese Z.* 12, 233 Abstract.
7. Müller, O. A., Braun, J., Fröhlich, R. & Scriba, P. C. (1974), *diese Z.* 12, 276–278.
8. Sterling, K. & Milch, P. O. (1974), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38, 866–875.
9. Surks, M. I., Schadow, A. R. & Oppenheimer, J. H. (1972), *J. Clin. Invest.* 51, 3104–3113.
10. Malkus, H. & Donabedian, R. K. (1974), *Clin. Chim. Acta* 51, 191–198.
11. Horn, K., Koeppen, D., Pickardt, C. R. & Scriba, P. C. (1975), *Klin. Wochenschr.* 53, 94–95.
12. Braun, J. (1973), Inauguraldissertation, München.
13. Braverman, L. E., Vagenakis, A. G., Foster, A. E. & Ingbar, S. H. (1971), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 32, 497–502.
14. Hilger, P., Herrmann, J. & Krüskemper, H.-L. (1973), *diese Z.* 11, 323–325.
15. Hesch, R. D., Hüfner, M. & von zur Mühlen, A. (1972), *Deut. Med. Wochenschr.* 97, 351–353.

Prof. Dr. P. C. Scriba
II. Med. Klinik d. Univ.
8 München 2
Ziemssenstr. 1